

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIULIA MOREIRA COUTO ARAÚJO

**EFEITOS TARDIOS DO ANTIVIRAL GANCICLOVIR SOBRE AS GÔNADAS DE  
RATOS EXPOSTOS *IN UTERO***

CURITIBA

2017

GIULIA MOREIRA COUTO ARAÚJO

**EFEITOS TARDIOS DO ANTIVIRAL GANCICLOVIR SOBRE AS GÔNADAS DE  
RATOS EXPOSTOS *IN UTERO***

Monografia apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel, Curso de Biologia,  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino  
Andrade

Coorientadora: Dra. Katlyn Barp Meyer

CURITIBA

2017

*... Só uma palavra fora registrada no cérebro de Arthur.*

*- Ratos?*

*- É, terráqueo.*

*- Escute, por acaso estamos falando sobre aquelas criaturinhas peludas que se amarram em queijo...?*

*Slartibartfast tossiu um pouco, polidamente.*

*- Terráqueo, essas criaturas chamadas ratos não são exatamente o que parecem ser. Não passam de protusões em nossa dimensão de seres pandimensionais imensos e hiperinteligentes. Toda essa história de queijo e guinchos é só fachada. - O velho fez uma pausa, uma careta simpática e prosseguiu. - Eles estavam fazendo experiências com vocês. Arthur pensou nisso por um segundo, e então seu rosto se desanuviou.*

*- Ah, não. - disse ele. - Agora entendi a origem desse mal-entendido. Não, o que acontecia é que nós é que fazíamos experiências com eles. Os ratos eram muito utilizados em pesquisas de comportamento, Pavlov, essas coisas. O que acontecia era que os ratos participavam de tudo quanto era experiência, aprendiam a tocar campainhas, corriam em labirintos, de modo que toda a natureza do processo de aprendizagem pudesse ser examinada. Com base nas observações do comportamento deles, a gente aprendia um monte de coisas a respeito do nosso comportamento...*

*A voz de Arthur foi morrendo aos poucos.*

*- Que sutileza! - Disse Slartibartfast. - É realmente admirável.*

*- Como assim?*

*- Para disfarçar melhor suas verdadeiras naturezas e orientar melhor o pensamento de vocês. De repente corriam para o lado errado de um labirinto, comiam o pedaço errado de queijo, inesperadamente morriam de mixomatose... a coisa sendo bem calculada, o efeito cumulativo é imenso. - Fez uma pausa para acentuar o efeito de suas palavras. - Sabe, terráqueo, eles são mesmo seres pandimensionais particularmente hiperinteligentes...Eu lhe conto toda a história. Vai levar algum tempo.*

*O Guia do Mochileiro das Galáxias, p 121.  
Douglas Adams*

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém  
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

O período de migração e proliferação das células germinativas primordiais são eventos críticos para o desenvolvimento e diferenciação gonadal e, insultos que eventualmente ocorram nessas fases podem prejudicar, muitas vezes de maneira irreversível, o funcionamento das gônadas. Dentre as substâncias que tem capacidade de interferir no desenvolvimento gonadal está o antiviral ganciclovir (GCV). Dados preliminares indicam que esse antiviral pode causar efeitos adversos sobre o desenvolvimento e função gonadal dos descendentes masculinos expostos *in utero* no 10º dia de gestação, e estudos desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR) indicaram que o ganciclovir poderia alterar os processos de migração, proliferação das células germinativas primordiais ou afetar a proliferação e sobrevivência dos gonócitos fetais nos túbulos seminíferos. Assim sendo, o presente trabalho investigou efeitos da exposição materna ao ganciclovir no 10º ou 14º dias de gestação sobre os sistemas reprodutivos dos descendentes masculinos e femininos aos 90 dias pós-natais. As progenitoras foram divididas em quatro grupos experimentais e receberam três aplicações em um único dia (às 08h, 13h e 18h) de veículo (água destilada; grupo controle) ou ganciclovir (grupos ganciclovir 10 e 14, 3 x 100 mg/kg) pela via subcutânea no 10º e 14º dias de gestação. Após a eutanásia dos descendentes, no 90º dia pós-natal, foram coletados os testículos e ovários para histologia e morfometria. Os efeitos observados no 14º dia de gestação nos descendentes machos, como a redução do peso testicular e presença de túbulos *Sertoli cell only*, foram mais pronunciados que aqueles observados no dia 10. Já nas fêmeas, a depleção no número de folículos em todos os estágios de desenvolvimento foi evidente tanto no 10º quanto no 14º dia de gestação. Desta forma, constatou-se que a exposição *in utero* ao ganciclovir nos períodos críticos para o desenvolvimento e diferenciação gonadal induziu efeitos adversos sobre o sistema reprodutivo masculinos e femininos.

Palavras-chave: Ganciclovir. Células germinativas primordiais. Desenvolvimento gonadal. Migração celular. Proliferação celular.

## ABSTRACT

The period of migration and proliferation of primordial germ cells are critical events to gonadal development and differentiation, and, insults that may occur in these phases can impair, often irreversibly, the functioning of the gonads. Among the substances that have the capacity to interfere in gonadal development is the antiviral ganciclovir (GCV). Preliminary data indicate that ganciclovir can cause adverse effects in the development and gonadal function of male offspring exposed to it *in utero* at the 10th gestational day, and studies developed at the Federal University of Paraná (UFPR), in the Laboratory of Animal Endocrine and Reproductive Physiology, indicated that ganciclovir could affect the processes of migration, proliferation of primordial germ cells or even affect the proliferation and survival of fetal gonocytes in the seminiferous tubules. Therefore, the present study investigated effects of maternal exposition to ganciclovir on the 10th or 14th gestational days on the reproductive systems of the male and female offspring at the 90th postnatal day. The female progenitors were divided into four experimental groups and received three applications in a single day (at 8:00 a.m., 1:00 p.m., and 6:00 p.m.) of vehicle (distilled water; control group) or ganciclovir (ganciclovir groups 10 and 14, 3 x 100 mg / kg) subcutaneously at the 10th and 14th gestational days. After the euthanasia of the offspring, at the 90th postnatal day, the testis and ovaries were collected for histology and morphometry. The observed effects on the 14th gestational day in male offspring, such as the reduction of testicular weight and the presence of *Sertoli cell only* tubules, were more pronounced than those observed on the 10th day. However, in females, depletion in the number of follicles at all stages of development was evident on both 10th and 14th gestational days. Thus, it was found that the exposure *in utero* to ganciclovir during critical gonadal periods, both development and differentiation, induced adverse effects on both male and female reproductive systems.

Key-words: Ganciclovir. Primordial germ cells. Gonadal development. Cell migration. Cell proliferation.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 ANIMAIS.....	14
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	14
3.3 EFEITOS PÓS-NATAIS DA EXPOSIÇÃO AO ANTIVIRAL GANCICLOVIR NO 10º E 14º DIAS DE GESTAÇÃO SOBRE OS DESCENDENTES MASCULINOS E FEMININOS .....	15
3.3.1 Avaliação dos descendentes masculinos adultos.....	15
3.3.2 Avaliação dos descendentes femininos adultos .....	17
<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>18</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
5.1 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES MASCULINOS ADULTOS.....	19
5.1.1 Peso absoluto dos testículos.....	19
5.1.2 Diâmetro dos túbulos seminíferos. ....	19
5.1.3 Número de espermátides redondas e células de Sertoli .....	20
5.2 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES FEMININOS ADULTOS .....	21
5.2.1 Peso absoluto dos ovários. ....	21
5.2.2 Número de folículos ovarianos nos diferentes estágios de desenvolvimento...21	
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>28</b>
<b>APÊNDICE 1 - HISTOLOGIA DOS OVÁRIOS .....</b>	<b>30</b>
<b>APÊNDICE 2 - FOLÍCULOS OVARIANOS .....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento gonadal em mamíferos se inicia com o estabelecimento do sexo genético (XX ou XY) na fertilização. As células germinativas primordiais (CGP), precursoras dos gametas masculinos e femininos, são derivadas de células epiblasticas, localizadas no mesoderma do saco vitelínico. A especificação das CGP ocorre aproximadamente no 6º dia de gestação (DG), em roedores, após a sinalização parácrina de moléculas secretadas pela ectoderme extraembrionária. Após a especificação, as CGP migram por processos passivo e ativo do mesoderma extraembrionário em direção as cristas genitais entre os dias 8 e 10 de gestação (FIGURA 1) (EWEN; KOOPMAN, 2010; FENG; BOWLES; KOOPMAN, 2014). Ao longo dessa trajetória, as células somáticas secretam moléculas que orientam a migração das CGP (EWEN; KOOPMAN, 2010).

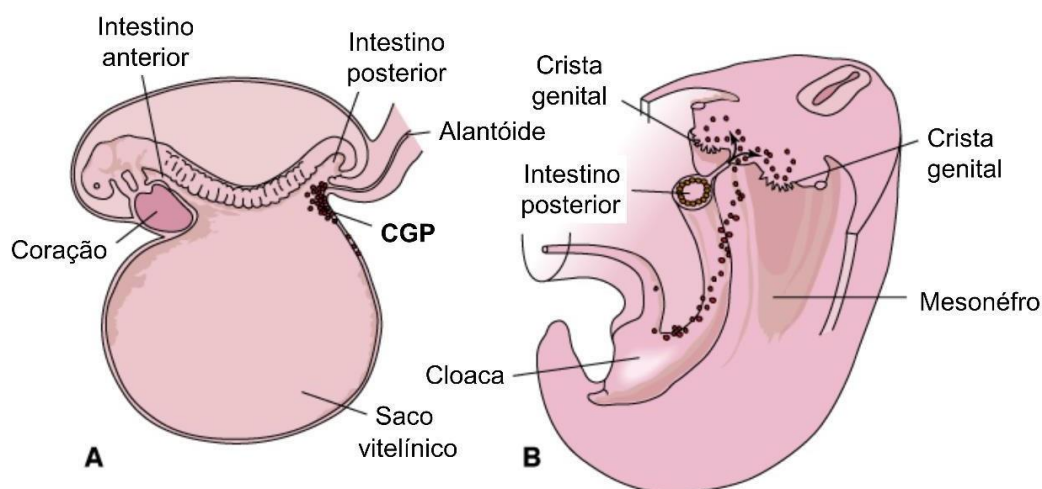


Figura 1<sup>1</sup> – Trajetória de migração das células germinativas primordiais

Fonte: adaptado de Gardner D.G., Shoback D. Endocrinology, 9ª edição. Domínio público, disponível em: <http://www.accessmedicine.com>.

O destino da gônada embrionária bipotencial é marcado pela expressão do gene *Sry*, a partir do 11º DG, em indivíduo do sexo masculino. Este gene, expresso nas células do epitélio celômico das cristas genitais, induz a diferenciação das células de Sertoli. Após o surgimento das células de Sertoli, as células de Leydig fetais diferenciam-se, provavelmente, a partir de fatores reguladores secretados pelas células de Sertoli, já que as células de Leydig fetais não

<sup>1</sup> Desenho esquemático de embrião de mamífero mostrando (A) as células germinativas primordiais (CGP) na parede do saco vitelínico, próximo ao alantóide. (B) Trajetória de migração das CGP a partir do endoderma do intestino posterior e mesentério dorsal do intestino posterior, até as cristas genitais.



expressam o gene *Sry*. À medida que as células germinativas primordiais chegam nas cristas genitais da gônada XY, aproximadamente entre o 10º e 13º DG, são envolvidas pelas células de Sertoli e, ao se tornarem residentes, passam a ser chamadas de gonócitos (pre-espermatogônias), caracterizando a determinação sexual primária (EWEN; KOOPMAN, 2010; KIM AND CAPEL, 2006). Na ausência do gene *Sry*, as células do epitélio celômico dão origem às células da granulosa na gônada XX, que passam a circundar as CGP, enquanto as células mesenquimatosas do ovário em desenvolvimento diferenciam-se em células da teca (KIM AND CAPEL, 2006; SHARPE, 2006). Após a colonização, as CGP no ovário passam a ser chamadas de oogônias.

Na gônada feminina, as CGP proliferam durante os períodos de migração (entre o 8º e 10º DG), colonização das cristas genitais (entre o 10º e 13º DG) e durante um a dois dias após a colonização, e em seguida entram em meiose entre os dias 14 e 15 de gestação (FIGURA 2) (DE FELICI et al., 2005). Porém este processo sofre parada na fase da prófase I (diplóteno) da meiose quando as células germinativas passam a ser consideradas oócitos. A atividade meiótica progride após o nascimento até a metáfase II e cessa novamente, finalizando a meiose somente após a fecundação (EWEN; KOOPMAN, 2010).

Na gônada masculina, os gonócitos se dividem mitoticamente com maior intensidade entre os dias 14 e 18 de gestação, e logo após entram em quiescência mitótica, permanecendo na fase G1 do ciclo celular (FIGURA 2) (BOULOGNE et al., 1999; CULTY, 2009). A mitose é retomada entre o 1º e 4º dias pós-natal (DPN), e no 4º DPN os gonócitos começam a se diferenciar em espermatogônias tipo A (BEAUMONT; MANDL, 1963; BOULOGNE et al., 1999). Assim, enquanto na gônada feminina existe um número fixo de células germinativas (oócitos), as espermatogônias na gônada masculina constituem uma população de células tronco capazes de se autorrenovar por mitoses.

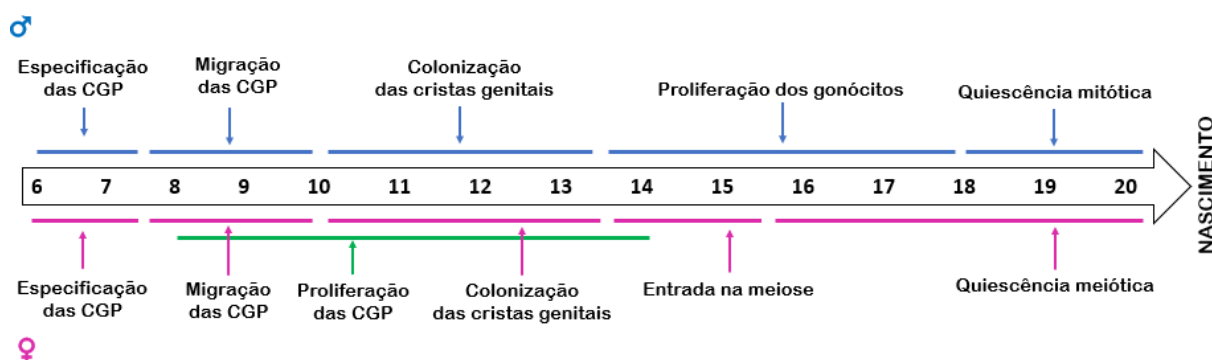


Figura 2. Linha temporal do desenvolvimento e diferenciação testicular (♂) e ovariana (♀) em ratos.

Fonte: Adaptado de (EWEN; KOOPMAN, 2010).

Legenda: CGP = células germinativas primordiais.

O período de migração e proliferação das CGP e da diferenciação das células somáticas gonadais são eventos críticos para o desenvolvimento e diferenciação gonadal. Dessa forma, insultos que eventualmente ocorram nessa fase podem prejudicar, muitas vezes de maneira irreversível, o funcionamento gonadal.

Dentre as substâncias que tem capacidade de interferir no desenvolvimento gonadal, está o antiviral ganciclovir (GCV). Ele é utilizado no tratamento de infecções causadas pelos herpesvírus, sendo particularmente eficaz contra o citomegalovírus, que acomete principalmente pessoas imunocomprometidas. Devido a possibilidade de infecção congênita, a citomegalovirose pode ocasionar danos graves em fetos contaminados *in utero*, como perda da audição ou atraso no desenvolvimento cognitivo (ADLER; NIGRO; PEREIRA, 2007). Embora o GCV apresente potencial teratogênico, a sua administração durante a gestação é relativamente eficaz na redução da carga viral fetal. Entretanto, o uso desse medicamento é bastante restrito em função dos efeitos adversos observados após a exposição gestacional em animais de laboratório, como retardo no desenvolvimento embrionário, fetos com microcefalia, e alteração no desenvolvimento gonadal em machos (HARTMANN *et al.*, 1991; FAQI *et al.*, 1997; NIHI *et al.*, 2014).

O ganciclovir é um derivado acíclico da guanosina capaz de inibir a atividade da DNA polimerase viral. Para isso, ele depende de três etapas de fosforilação para ser ativado. Em células infectadas com herpesvírus, a timidina quinase viral fosforila o ganciclovir na forma de monofosfato e as enzimas celulares convertem o monofosfato nos compostos di- e trifosfato, que é reconhecido como trifosfato de guanosina pela DNA polimerase viral, com a consequente inibição da replicação do vírus (FIGURA 3) (CRUMPACKER, 1996). Embora haja necessidade da fosforilação

inicial pela quinase viral, os metabólitos do GCV também são encontrados em células não infectadas, possivelmente pela transferência via junções GAP, ou pela capacidade de fosforilação intrínseca de alguns tipos celulares. Dessa forma, o GCV é uma substância potencialmente nociva capaz de provocar distúrbios reprodutivos (GENTRY; DRACH, 2014).

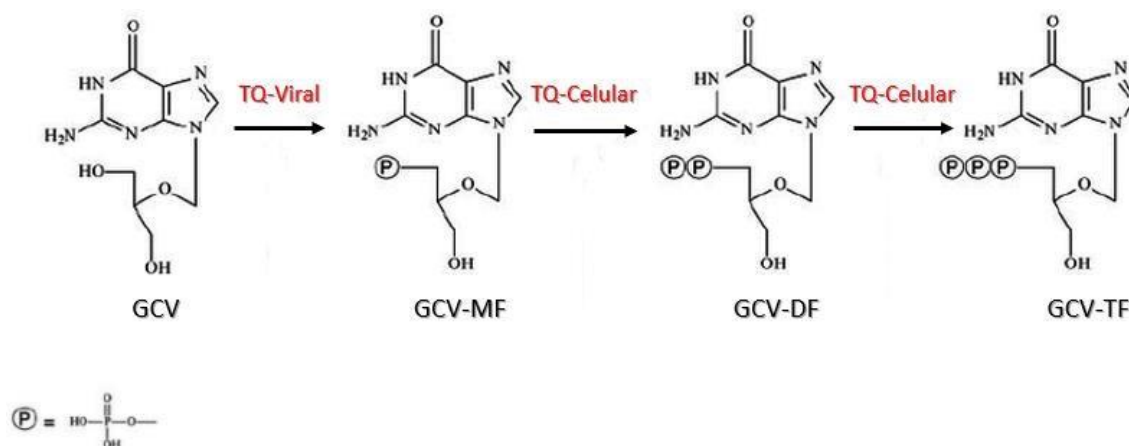


Figura 3. Conversão do ganciclovir nos compostos mono-, di- e trifosfato pelas enzimas timidina quinase viral e celular.

Fonte: O autor (2017).

Legenda: GCV= ganciclovir; GCV-MF= ganciclovir monofosfato; GCV-DF= ganciclovir difosfato; GCV-TF= ganciclovir trifosfato; TQ-Viral= timidina quinase viral; TQ-Celular= timidina quinase celular.

Em 1991, Hartmann e colaboradores demonstraram que a administração materna do antiviral ganciclovir no 10º dia de gestação em ratas (3 x 100 mg/kg pela via subcutânea) ocasiona alterações testiculares graves nos descendentes masculinos. Também há evidências de efeitos do ganciclovir sobre o epitélio germinativo em ratos infectados com herpes simples, os quais apresentaram menor peso testicular e atrofia do epitélio seminífero, com presença de túbulos seminíferos contendo apenas células de Sertoli (*Sertoli cell-only syndrome*; NEYTS et al., 1995).

Um estudo realizado em nosso laboratório (NIHI et al., 2014) ampliou os estudos iniciais de Hartmann *et al.* (1991) e caracterizou os efeitos testiculares após a exposição a uma dose elevada de ganciclovir (3 x 100 mg/kg, intervalo de 4 horas entre as aplicações, via subcutânea) no 10º dia de gestação. Os fetos avaliados no 20º DG apresentaram redução do diâmetro dos cordões seminíferos e no número de gonócitos, assim como a ocorrência de cordões seminíferos com ausência total de gonócitos. Nos animais avaliados aos 90 dias, encontrou-se menor peso dos testículos e epidídimos, baixa contagem de espermátides e alterações histológicas testiculares, como túbulos seminíferos atrofiados e com ausência de células germinativas (*Sertoli cell-only syndrome*).

Esses resultados indicam que a exposição gestacional durante uma curta janela do desenvolvimento pré-natal (décimo dia de gestação) ao ganciclovir ocasiona alterações estruturais nos machos, e os efeitos testiculares manifestam-se tanto precoce quanto tardiamente. Esses distúrbios podem estar relacionados com a proliferação das células germinativas durante a migração às cristas genitais no dia 10 de gestação. Alternativamente, o ganciclovir poderia afetar também a função das células de Sertoli, que são fundamentais para a proliferação e sobrevivência dos gonócitos no ambiente testicular. Assim como nos machos, é possível que o ganciclovir atue sobre a migração e proliferação das CGP nas fêmeas. As possíveis alterações provocadas pelo GCV no período de proliferação pré-meiótica poderiam levar à depleção das reservas foliculares, uma vez que a divisão meiótica não reestabelece o número de CGP.

Entretanto, não existem estudos evidenciando os efeitos do tratamento com o ganciclovir nos ovários, embora sabe-se que, assim como os testículos, as gônadas femininas sofrem alterações após a exposição a xenobióticos, uma vez que estes podem afetar a linhagem das células germinativas (FOWLER et al., 2012; ZAMA; UZUMCU, 2010). Como consequência, o número de folículos primordiais pode ser reduzido drasticamente, ocasionando redução na quantidade dos folículos em crescimento (HOLM et al., 2016). Sendo assim, este estudo visa fornecer dados mais completos sobre os efeitos que o ganciclovir acarreta sobre os sistemas reprodutores masculinos e femininos em termos de morfologia e função gonadal, após a exposição durante dois períodos pré-natais, dia 10 e dia 14 de gestação. Esses dias foram selecionados, pois constituem períodos de intensa migração e proliferação das células germinativas. Assim, os resultados do presente estudo podem não somente indicar possíveis riscos associados à exposição pré-natal ao ganciclovir, como também fornecer um modelo de estudo dos processos envolvidos no desenvolvimento e diferenciação gonadal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos da exposição *in utero* ao antiviral Ganciclovir sobre o sistema reprodutivo de ratos, machos e fêmeas, aos 90 dias pós-natais.

### 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 investigar os efeitos da exposição materna ao ganciclovir no 10º ou 14º dias de gestação sobre os descendentes masculinos e femininos adultos quanto aos seguintes parâmetros:

- Peso de testículos e ovários;
- Diâmetro dos túbulos seminíferos nos descendentes masculinos;
- Número de células da linhagem germinativa e células de Sertoli nos túbulos seminíferos dos descendentes masculinos (estágio VII);
- Número de folículos ovarianos nos diferentes estágios de desenvolvimento nas descendentes fêmeas;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Os procedimentos experimentais com os animais, incluindo a obtenção das progenitoras e tratamento com o ganciclovir, foram realizados como parte de um estudo maior do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva Animal do Departamento de Fisiologia da UFPR. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob o número 793.

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar, criados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, Curitiba. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e receberam água e ração (Nuvilab, Colombo, Brazil) *ad libidum*. Para a obtenção das progenitoras, as ratas foram acasaladas com ratos machos adultos durante a fase escura do ciclo de luz (3 horas), na proporção de um macho para três fêmeas. Esfregaços vaginais foram feitos com auxílio de uma micropipeta contendo 30  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de sódio 0,9% e analisados em microscópio óptico para verificar a presença de espermatozóides e confirmar a cópula. O dia de detecção dos espermatozóides foi considerado como dia zero da gestação (CHAHOU AND KWASIGROCH, 1977). Os acasalamentos foram repetidos diariamente até a obtenção de um número suficiente de progenitoras para a realização dos experimentos.

#### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após a confirmação de espermatozóides no lavado vaginal, as ratas gestantes foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos controle e ganciclovir. De acordo com o grupo, as ratas gestantes receberam três aplicações (08h; 13h e 18h) de 100 mg/kg de ganciclovir (grupo G) ou 1 mL/kg de salina 0,9% (grupo C), via subcutânea, nos dias 10 ou 14 de gestação (DG), conforme descrito abaixo:

- a) Controle 10: progenitoras tratadas com veículo no 10º DG (3x salina);
- b) Controle 14: progenitoras tratadas com veículo no 14º DG (3x salina);

c) Ganciclovir 10: progenitoras tratadas no 10º DG (3x 100mg/kg);

d) Ganciclovir 14: progenitoras tratadas no 14º DG (3x 100mg/kg);

Foi utilizado ganciclovir sódico (Novafarma, Anápolis, Brasil), liofilizado, destinado para o tratamento intravenoso de pessoas infectadas com citomegalovírus. O conteúdo dos 20 frascos (500 mg) foi diluído em água destilada de forma a alcançar a concentração apropriada para a administração de 1 mL/kg, via subcutânea, nas ratas gestantes. O conteúdo diluído foi mantido protegido da luz, em temperatura ambiente e utilizado em menos de 12 horas, de acordo com as recomendações do fabricante. As doses, bem como a via e os intervalos de administração foram baseados em estudos prévios (FAQI et al., 1997; NIHI et al., 2014; STAHLMANN et al., 1988).

### 3.3 EFEITOS PÓS-NATAIS DA EXPOSIÇÃO AO ANTIVIRAL GANCICLOVIR NO 10º E 14º DIAS DE GESTAÇÃO SOBRE OS DESCENDENTES MASCULINOS E FEMININOS

Ratas gestantes expostas ao ganciclovir ou à solução salina 0,9% nos dias 10 ou 14 de gestação foram mantidas com as suas ninhadas até o desmame. Após esse período, as progenitoras foram eutanasiadas por decapitação, e os descendentes mantidos em gaiolas respeitando o máximo de quatro animais por caixa, mantendo indivíduos da mesma ninhada e sexo juntos, até o 90º dia pós-natal. Nesse dia, foram realizadas as eutanásias dos descendentes masculinos e femininos para a investigação dos efeitos tardios da exposição *in utero* ao ganciclovir.

#### 3.3.1 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES MASCULINOS ADULTOS

Aos 90 dias pós-natais, foram escolhidos aleatoriamente até três descendentes masculinos de cada ninhada, submetidos à perfusão intracardíaca, enquanto os demais foram eutanasiados por decapitação. A perfusão intracardíaca foi realizada conforme descrito por TENORIO *et al.*, (2011), com o objetivo de obter uma melhor fixação do parênquima testicular. Nos animais decapitados procedeu-se

a coleta de órgãos, registrando-se o peso de fígado, rins, adrenais, baço, testículos, epidídimos, vesículas seminais (sem conteúdo), próstata ventral (sem a cápsula), glândula do pênis e músculo levantador do ânus.

Os animais submetidos à perfusão intracardíaca foram tratados com heparina (150 UI/ 100g de peso corporal, i.p.), anestesiados com xilazina (1,5 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (75 mg/kg, i.p.) e submetidos à toracotomia. Em seguida, foram perfundidos (bomba peristáltica, EL 500, Insight; 30 rpm) com salina 0,9% contendo heparina 0,1% (v:v), por 15 min e, então, com glutaraldeído 4% (v:v, em PBS, pH 7,2), por 45 min. Os testículos foram, então, coletados e mantidos em glutaraldeído 4% por 24 h, antes de serem cortados perpendicularmente em seções de 2 – 3 mm de espessura as quais permaneceram imersas em glutaraldeído 4% até o processamento. Após serem lavadas em PBS (pH 7,2; 24 h, 4°C) e mantidas em álcool 70% por 48 h à 4°C, foi escolhida uma seção representativa da porção central do testículo, e retirada uma amostra retangular, a qual foi desidratada e emblocada em glicol metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit).

Seções histológicas de 4 µm de espessura foram coradas com hematoxilina-floxina e analisadas morfometricamente quanto ao diâmetro dos túbulos seminíferos. Além disso, foram averiguados o peso testicular, número de espermátides redondas e número de células de Sertoli por seção transversal de túbulos seminíferos em estágio VII de desenvolvimento.

Para a realização das análises morfométricas foram tiradas fotografias, na objetiva de 100x, do parênquima testicular, em um microscópio (Olympus BX-51, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera fotográfica (Olympus DP-72, Tóquio, Japão) e conectado ao programa (Cell<sup>^</sup>F Olympus Europe, version 5.2). As fotografias foram analisadas com o programa Image J (versão 1.46r, domínio público). Em cada animal, o diâmetro dos túbulos seminíferos foi medido em 15 seções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram o contorno circular, com lúmen visível e sem levar em consideração o estágio de desenvolvimento. Enquanto que as espermátides redondas e células de Sertoli foram contadas em 5 túbulos seminíferos em estágio VII da espermatogênese, sob microscópio (CarlZeiss, Standard 20, Alemanha). Para essas contagens foram contados todos os nucléolos das células de Sertoli e os núcleos das espermátides redondas nas cinco seções transversais em estágio VII selecionadas. Além disso, foram medidos os diâmetros de 10 nucléolos



de células de Sertoli e 10 núcleos de espermatídes redondas em fotomicrografias (aumento 1000x) analisadas no programa Image J. As contagens foram então corrigidas pelos diâmetros médio dos nucléolos ou núcleos e pela espessura do corte de acordo com a fórmula de Abercrombie (ABERCROMBIE, 1946). Os resultados das contagens de células foram expressos como número médio de células por túbulo seminífero.

### 3.3.2 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES FEMININOS ADULTOS

No 90º dia, foram escolhidas aleatoriamente duas fêmeas, em estro, de três a cinco ninhadas por grupo, e eutanasiadas por decapitação. Os ovários esquerdo e direito de cada fêmea foram pesados e posteriormente fixados em ALFAC (*85% de etanol 80%, 10% de formol, 5% de ácido acético*) durante quatro horas e armazenados em álcool 70% até o processamento histológico. Para cada fêmea foram preparadas três lâminas histológicas, com seções de 5 µm de espessura e coradas com hematoxilina-eosina.

De cada fêmea foram analisados dois cortes por lâmina, totalizando seis cortes por fêmea. Foram classificados e quantificados os folículos ovarianos, cujo núcleo do oócito era visível, distinguidos em primordial/primário, secundário e terciário. Os folículos ovarianos foram classificados de acordo com PEDERSEN; PETERS (1968), sendo os folículos primordiais e primários aqueles identificados por um oócito circundado por uma única camada de células epiteliais cuboidais, enquanto os oócitos dos folículos secundários são circundados por mais de uma camada celular, podendo uma das camadas ser incompleta. Já o folículo terciário é distinguido pela presença da cavidade antral. Os folículos primordiais e primários foram analisados na objetiva de 20x, e os folículos secundário e terciário foram analisados na objetiva de 10x, ambos em um microscópio de luz (CarlZeiss, Standart 20, Alemanha). Foram obtidas imagens a partir do escaneamento de uma seção histológica, com objetiva de 100x, utilizando o microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/VSlide (Metasystems, Altlussheim, DE), acoplado a câmera CoolCube 1 (Metasystems, Altlussheim, DE) no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal (LABCONFOCAL – UFPR).

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram avaliadas quanto à normalidade e homogeneidade entre as variâncias e comparados por meio de ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. As ninhadas foram utilizadas como unidades estatísticas e o nível de significância estatística utilizado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

Inicialmente alguns animais foram separados em dois grupos controle (C10 e C14) e analisados separadamente. Contudo, como não foram encontradas diferenças significativas entre eles, optamos por combinar os dados formando apenas um grupo controle para as análises subsequentes.

Para a análise estatística e a confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism® versão 6.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DOS DESCENTES MASCULINOS ADULTOS

#### 5.1.1 Peso absoluto dos testículos

O peso absoluto dos testículos foi significativamente reduzido nos animais adultos expostos *in utero* ao antiviral ganciclovir quando comparado ao controle (figura 1), sendo que a redução foi mais acentuada nos animais do grupo G14.

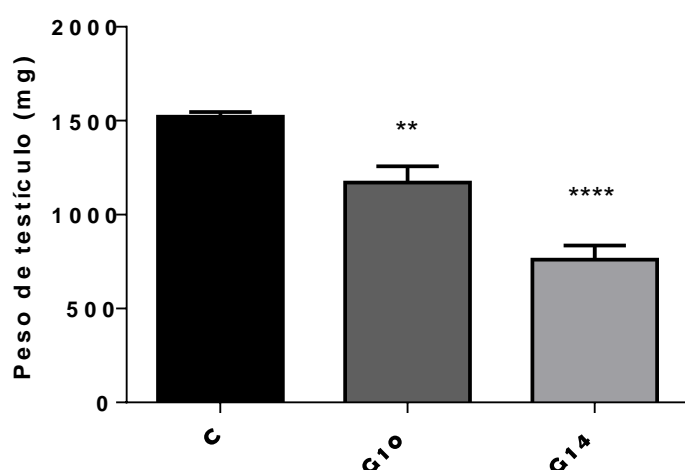


Figura 4 – Média ( $\pm$  erro padrão) do peso absoluto dos testículos de animais adultos expostos à 1 mL/kg de solução salina (C; n= 11) ou à 300 mg/kg de ganciclovir nos dias 10 (G10; n= 9) e 14 (G14; n=11) de gestação. \* Difere significativamente do controle (\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ANOVA - Tukey).

#### 5.1.2 Diâmetro dos túbulos seminíferos

Os animais expostos ao ganciclovir (DG 10 e 14) apresentaram alguns túbulos seminíferos atrofiados, com depleção de células germinativas (*Sertoli cell only*) (FIGURA 4). Essa alteração foi encontrada em todos os testículos de animais expostos ao ganciclovir no dia 14 de gestação, com uma frequência de aproximadamente 30%. Por outro lado, os animais expostos no 10º DG, o percentual de túbulos *Sertoli cell only* foi de 12% e nem todos os animais apresentaram essa alteração. Assim, na avaliação do diâmetro tubular, foram considerados apenas os túbulos com morfologia normal. Nesses túbulos, o diâmetro foi significativamente maior nos animais expostos ao ganciclovir no 14º DG quando comparado aos animais do grupo controle (TABELA 1).

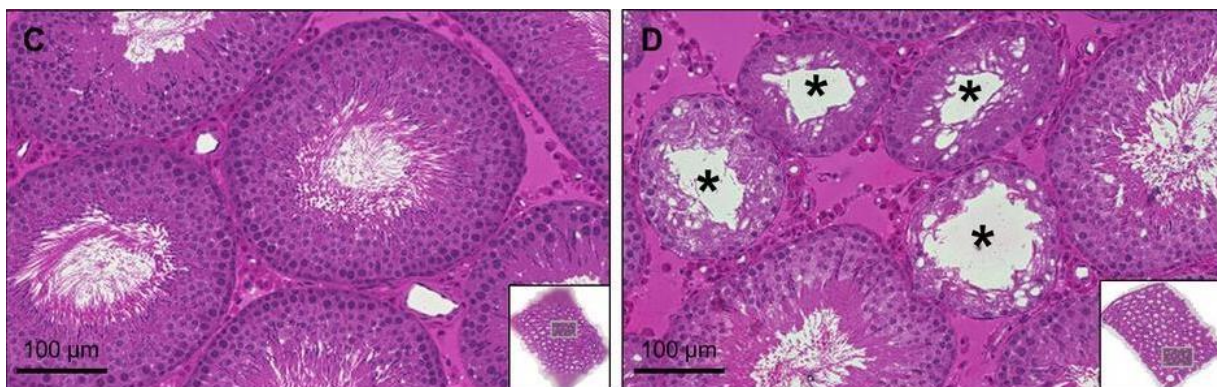


Figura 5<sup>2</sup>. Aspecto histológico testicular de ratos adultos (90º dia pós-natal) após exposição *in utero* nos dias de gestação 10 ou 14 ao veículo (controle; C) ou 300mg/kg de ganciclovir (GCV; D).  
Fonte: MEYER et al., 2017, no prelo.

TABELA 1 – MORFOMETRIA DE TÚBULOS SEMINÍFEROS NORMAIS DE RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS AO GANCICLOVIR NOS DIAS 10 OU 14 DE GESTAÇÃO.

	Controle (n = 13)	G10 (n = 9)	G14 (n = 7)
<b>Diâmetro do túbulo normal (µm)</b>	317,8 ± 3,0	327,2 ± 2,9	331,7 ± 3,9 *

Notas: Os resultados expressam médias ± desvios padrões. \* Difere significativamente do controle (\* p<0,05; ANOVA - Tukey). *n*: número de ninhadas.

### 5.1.3 Número de espermátides redondas e células de Sertoli

O número de espermátides redondas e células de Sertoli por seção transversal em túbulos seminíferos em estágio VII não apresentou diferença significativa entre os grupos (tabela 2).

TABELA 2 – NÚMERO DE ESPERMÁTIDES REDONDAS E CÉLULAS DE SERTOLI EM TÚBULOS SEMINÍFEROS EM ESTÁGIO VII DE RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS AO GANCICLOVIR NOS DIAS 10 OU 14 DE GESTAÇÃO.

	Controle (n = 12)	G10 (n = 9)	G14 (n = 7)
<b>Espermátides redondas</b>	76,7 ± 1,5	80,4 ± 1,9	82,1 ± 1,9
<b>Células de Sertoli</b>	9,9 ± 0,3	9,6 ± 0,4	9,1 ± 0,4

Notas: Os resultados expressam médias ± desvios padrões do número de células por seção transversal. *n*: número de ninhadas.

<sup>2</sup> Os animais do grupo C apresentaram todos os túbulos seminíferos com aspecto normal, enquanto que os animais expostos ao GCV apresentaram túbulos seminíferos *Sertoli cell only* (SCO; \*)

## 5.2 AVALIAÇÃO DOS DESCENTES FEMININOS ADULTOS

### 5.2.1 Peso absoluto dos ovários

Não houve diferença significativa no peso absoluto dos ovários nos animais adultos expostos *in utero* ao antiviral ganciclovir em relação ao controle (figura 2).

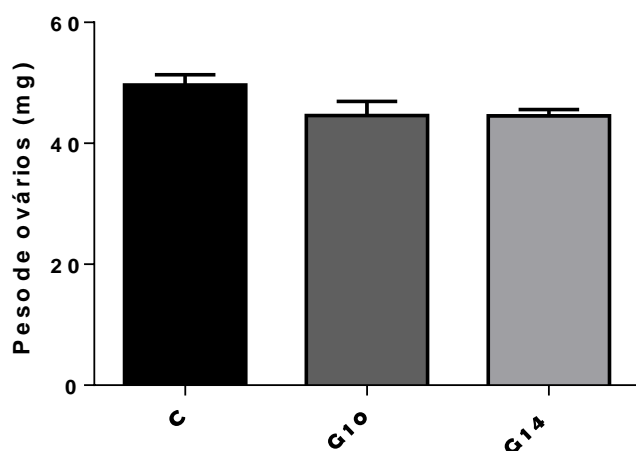


Figura 6 – Média ( $\pm$  erro padrão) do peso absoluto dos ovários de animais adultos expostos à 1 mL/kg de solução salina (C; n: 5) ou à 300 mg/kg de ganciclovir nos dias 10 (G10; n: 4) e 14 (G14; n: 3) de gestação.

### 5.2.2 Número de folículos ovarianos nos diferentes estágios de desenvolvimento

A média do número de folículos primordiais/primários, secundários e terciários foi significativamente reduzido nos animais adultos expostos *in utero* ao antiviral ganciclovir quando comparado ao controle (TABELA 3). A Figura 4 mostra a média da contagem de todos os folículos, sem levar em consideração o estágio de desenvolvimento folicular. Embora tenha ocorrido redução mais acentuada nos animais tratados com ganciclovir no 10º dia de gestação em todos os estágios foliculares, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com o antiviral.

TABELA 3. MÉDIA DO NÚMERO DE FOLÍCULOS OVARIANOS NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO.

	<b>Controle (n: 5)</b>	<b>G10 (n: 4)</b>	<b>G14 (n: 3)</b>
<b>Primordial/Primário</b>	12,96 ± 2,16	1,71 ± 0,64 ****	1,86 ± 1,11 ****
<b>Secundário</b>	2,00 ± 0,57	0,63 ± 0,26 **	0,92 ± 0,15 *
<b>Terciário</b>	3,39 ± 0,26	1,48 ± 0,39 ****	1,69 ± 0,17 ****

Notas: Os resultados expressam médias ± desvios padrões. \* Difere significativamente do controle \* p<0,01; \*\* p<0,001; \*\*\*\* p< 0,0001; ANOVA - Tukey). *n*: número de ninhadas.

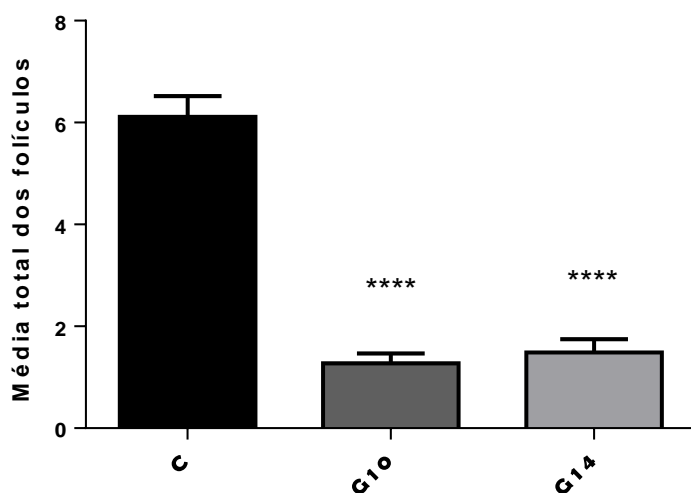


Figura 7 – Média (± erro padrão) total do número de folículo de animais adultos expostos à 1 mL/kg de solução salina (C; n: 5) ou a 300 mg/kg de ganciclovir nos dias 10 (G10; n: 4) e 14 (G14; n: 3) de gestação. \* Difere significativamente do controle (\*\*\*\* p< 0,0001; ANOVA - Tukey).

## 6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento gonadal, que se inicia após o estabelecimento do sexo genético, ocorre em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de mamíferos e é essencial para as etapas posteriores da diferenciação sexual. A migração e a proliferação das CGP são eventos críticos para o desenvolvimento e diferenciação gonadal. Dessa forma, a exposição a xenobióticos que eventualmente ocorram nessas fases pode prejudicar, muitas vezes de maneira irreversível, o desenvolvimento e o funcionamento gonadal.

No presente estudo, foram investigados os efeitos causados nos descendentes masculinos e femininos adultos expostos *in utero* ao antiviral ganciclovir nos dias 10 e 14 de gestação. Os resultados obtidos demonstraram que a administração do ganciclovir em ratas gestantes em um único dia do período gestacional – décimo ou décimo quarto dia de gestação - foi capaz de produzir efeitos tardios nos testículos e ovários, os quais podem ter ocasionados consequências irreversíveis para os descendentes.

No 14<sup>o</sup> dia de gestação as células germinativas primordiais dos descendentes masculinos já alcançaram as cristas genitais e passam a ser denominadas de gonócitos, uma vez que são circundados pelas células de Sertoli, para iniciar a formação dos cordões seminíferos. Nesse período há intensa proliferação mitótica, e estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que o ganciclovir parece ter efeito mais pronunciado sobre as células em proliferação (MEYER et al., 2017, no prelo; NIHI et al., 2014). Como consequência, é possível observar túbulos seminíferos atrofiados e com ausência de células germinativas (*Sertoli cell-only syndrome* - SCO). No presente estudo, túbulos seminíferos *Sertoli cell only* foram encontrados em todos os testículos de animais expostos ao ganciclovir no dia 14 de gestação, com uma frequência de aproximadamente 30%. Já nos animais expostos no dia 10, o percentual de túbulos *Sertoli cell only* foi de 12% e nem todos os animais apresentaram essa alteração. Esses túbulos podem ter perturbado a arquitetura normal dos testículos, ocasionando aumento no diâmetro dos túbulos seminíferos normais nos animais expostos ao GCV, especialmente no dia 14. Além disso, a presença de túbulos SCO pode ter originado testículos menores, já que foi observada uma severa redução no peso testicular dos animais expostos ao antiviral.

A proliferação das CGP é menos intensa no dia 10 de gestação, período em que estão migrando do mesoderma extraembrionário em direção às cristas genitais, e, possivelmente devido a esse motivo, os efeitos do GCV foram menos pronunciados nos animais expostos neste dia. Embora os efeitos tóxicos do ganciclovir tenham sido observados na morfologia dos túbulos seminíferos, a contagem de espermátides redondas por seção transversal em túbulos seminíferos em estágio VII demonstrou que a espermatogênese está ocorrendo sem perda de células germinativas nos animais expostos ao GCV. Ou seja, apesar da presença de túbulos atrofiados (SCO), os túbulos não afetados parecem ter espermatogênese normal. Isso pode ser resultado da heterogeneidade da população de células germinativas em cada estágio do desenvolvimento testicular. Diferenças na taxa de proliferação, no comportamento migratório, assim como no tempo em que as CGP alcançam as cristas genitais podem influenciar na sensibilidade aos efeitos tóxicos do GCV. Assim, enquanto alguns túbulos podem ser severamente afetados, com intensa depleção de células germinativas, outros podem ter um desenvolvimento normal e ausência de alterações qualitativas e quantitativas nas associações celulares observadas em cortes transversais na idade adulta.

Essa heterogeneidade também pode estar relacionada com a variação no percentual de túbulos seminíferos SCO nos animais adultos expostos nos dias 10 e 14 de gestação, que corresponderam a 12% e 30% do total de túbulos, respectivamente. Além disso, animais do grupo G10 podem ter mais tempo para recuperar o número de células germinativas após a exposição ao GCV e apresentar menor percentual de túbulos SCO, uma vez que a atividade mitótica, que ocorre aproximadamente entre os dias 14 e 18 de gestação, reestabelece o número dessas células.

Enquanto que nos machos o efeito do ganciclovir foi mais pronunciado no 14º DG, possivelmente devido à alta taxa de proliferação das células germinativas, nas fêmeas o efeito tóxico do antiviral pôde ser observado com igual relevância em ambos os dias de exposição. As células germinativas primordiais das descendentes femininas estão em intensa atividade mitótica entre os dias 10 e 14 de gestação, período que corresponde a migração e colonização das cristas genitais. Além disso, diferentemente do que ocorre nos machos, as células germinativas femininas (oogônias) entram em meiose, aproximadamente no 15º DG e, logo após, permanecem quiescentes na fase de prófase I até o nascimento. Portanto, insultos



que comprometam o número de células germinativas que entram em meiose podem desencadear consequências nas fêmeas adultas, já que a atividade meiótica não reestabelece o número de oogônias.

Apesar de ter ocorrido redução significativa no número de folículos nos animais expostos ao GCV nos dias 10 e 14 de gestação, o peso dos ovários não foi alterado, possivelmente devido a sua estrutura morfológica que, além dos folículos, situados no córtex ovariano, são constituídos de estroma e corpos lúteos.

Os efeitos citotóxicos do GCV, principalmente sobre as células germinativas primordiais, estão relacionados ao seu mecanismo de ação. A atividade antiviral do GCV depende da conversão inicial ao monofosfato, reação catalisada pela timidina quinase viral expressa em células infectadas, seguido pela conversão às formas di- e trifosfatadas pelas quinases da célula hospedeira. Após a sua conversão para a forma ativa trifosfatada, o antiviral é incorporado à sequência de DNA do vírus, pela DNA polimerase viral, interrompendo a síntese do material genético. De forma semelhante, o GCV trifosfatado pode ser incluído na sequência de DNA da célula, induzindo a terminação da síntese de DNA e, conseqüentemente, a morte celular (ADLER; NIGRO; PEREIRA, 2007; CRUMPACKER, 1996; MATTHEWS; BOEHME, 1988).

A expressão de timidina quinase endógena pode ser relativamente alta durante a fase S do ciclo celular, e com isso células não infectadas que possuem altas taxas de proliferação, como as células germinativas primordiais, podem apresentar níveis elevados de GCV trifosfato (SHERLEY; KELLY, 1988). Embora outros tipos de células, livres de timidina quinase viral, também possam ativar o GCV (FREITAS et al., 1985; HAYNES; LAMBERT; MITCHELL, 1996; JANOLY-DUMENIL et al., 2012) as células germinativas parecem ter um mecanismo regulatório intrínseco da expressão de timidina quinase, tornando-as muito sensíveis ao GCV (AL-SHAWI et al., 1991).

Durante o desenvolvimento embrionário, particularmente em janelas críticas do desenvolvimento gonadal, como as testadas no nosso estudo, o GCV é capaz de induzir a morte das células germinativas, causando redução do seu número com repercussões que podem ser observadas até a vida adulta (ex.: alterações testiculares e redução no número de folículos ovarianos). Neste estudo, nós não avaliamos em detalhes os efeitos do GCV sobre a proliferação e diferenciação de

outros tecidos. Entretanto, não foram observadas alterações estruturais macroscópicas ou no peso de outros órgãos, como fígado, baço, rins e adrenais (dados não incluídos no trabalho), sugerindo ausência de efeito tóxico do GCV sobre estes órgãos.

Além disso, a detecção de efeitos testiculares mais severos nos animais expostos no dia 14 em comparação ao dia 10 de gestação, sugerem que a janela mais crítica para a indução de efeitos adversos sobre as células germinativas coincide com o período de maior proliferação dessas células. Por outro lado, esse efeito diferencial entre os dias 10 e 14 de gestação não foi observado nos ovários, possivelmente porque não há uma diferença tão evidente na taxa de proliferação das células germinativas nesses dois períodos em fêmeas, uma vez que o dia 10 corresponde a um período de maior migração e o dia 14 ao final da fase proliferativa e início da entrada na meiose.

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo confirmou o potencial do antiviral ganciclovir em causar efeitos adversos sobre sistema reprodutivo de ratos machos e fêmeas adultos após a exposição em um único dia do período gestacional – décimo ou décimo quarto dia de gestação. Os efeitos observados foram redução do peso testicular e presença de túbulos Sertoli cell only nos descendentes masculinos, e nos descendentes femininos, depleção no número de folículos em todos os estágios de desenvolvimento.

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o ganciclovir, assim como outros compostos químicos capazes de prejudicar o sistema reprodutivo masculino e feminino, pode induzir efeitos adversos sobre o sistema reprodutivo de indivíduos expostos durante períodos críticos do desenvolvimento e diferenciação gonadal.

## REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from Microtome sections. *The Anatomical Record*, v. 94, n. 2, p. 239–247, 1946.

ADLER, S. P.; NIGRO, G.; PEREIRA, L. Recent Advances in the Prevention and Treatment of Congenital Cytomegalovirus Infections. **Seminars in Perinatology**, v. 31, n. 1, p. 10–18, 2007.

AL-SHAWI, R. et al. The herpes simplex virus type 1 thymidine kinase is expressed in the testes of transgenic mice under the control of a cryptic promoter. **Molecular and cellular biology**, v. 11, n. 8, p. 4207–4216, 1991.

BEAUMONT, H. M.; MANDL, A. M. A Quantitative Study of Primordial Germ Cells in the Male Rat. **J Embryol Exp Morphol**, v. 11, n. December, p. 715–740, 1963.

BOULOGNE, B. et al. Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 356–365, 1999.

CHAHOU, I.; KWASIGROCCH, T. E. Controlled breeding of laboratory animals. In. **Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, p. 79-91, 1977.

CRUMPACKER, C. S. Ganciclovir. **New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 10, p. 721–729, 5 set. 1996.

CULTY, M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 87, n. 1, p. 1–6, 2009.

DE FELICI, M. et al. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. **Reproductive biomedicine online**, v. 10, n. 2, p. 182–191, 2005.

EWEN, K. A.; KOOPMAN, P. Mouse germ cell development: From specification to sex determination. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, n. 1, p. 76–93, 2010.

FAQI, A. S. et al. Ganciclovir induces reproductive hazards in male rats after short-term exposure. **Hum Exp Toxicol**, v. 16, n. 9, p. 505–511, 1997.

FENG, C.; BOWLES, J.; KOOPMAN, P. **Control of mammalian germ cell entry into meiosis** *Molecular and Cellular Endocrinology* Elsevier Ireland Ltd, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.026>>

FOWLER, P. A. et al. Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 355, n. 2, p. 231–239, 2012.

FREITAS, V. R. et al. Activity of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine compared with that of acyclovir against human, monkey, and rodent cytomegaloviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 28, n. 2, p. 240–245, 1985.

GENTRY, B.; DRACH, J. Metabolism of Cyclopropavir and Ganciclovir in Human Cytomegalovirus-Infected Cells. *ASM Journals*, v. 58, n. 4, p. 2329–2333, 2014.

HARTMANN, J.; CHAHOUD, I.; BUERKLE, B.; NEUBERT, D. Testis hypoplasia in rat offspring prenatally exposed to ganciclovir. *European Teratology Abstracts*, 25A, 1991.

HAYNES, P.; LAMBERT, T. R.; MITCHELL, I. D. Comparative in-vivo genotoxicity of antiviral nucleoside analogues; penciclovir, acyclovir, ganciclovir and the xanthine analogue, caffeine, in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutation research*, v. 369, n. 1–2, p. 65–74, jul. 1996.

HOLM, J. B. et al. Intrauterine Exposure to Paracetamol and Aniline Impairs Female Reproductive Development by Reducing Follicle Reserves and Fertility. *Toxicological Sciences*, v. 150, n. 1, p. 178–189, 2016.

JANOLY-DUMENIL, A. et al. A pharmacodynamic model of ganciclovir antiviral effect and toxicity for lymphoblastoid cells suggests a new dosing regimen to treat cytomegalovirus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 7, p. 3732–3738, 2012.

JOST, A.; MAGRE, S.; AGELOPOULOU, R. Early stages of testicular differentiation in the rat. *Human Genetics*, v. 58, n. 1, p. 59–63, 1981.

KIM, Y. AND; CAPEL, B. Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates: A new perspective on an old problem. *Developmental Dynamics*, v. 235, n. 9, p. 2292–2300, 2006.

MACLEOD, D. J. et al. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 2, p. 279–286, 2010.

MEYER, K. B. et al. Identification of a critical window for ganciclovir-induced disruption of testicular development in rats. **Toxicological Sciences**. No prelo, 2017.

NEYTS, J. et al. In vivo antiherpesvirus activity of N-7-substituted acyclic nucleoside analog 2-amino-7-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy) methyl]purine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 56–60, 1995.

NIHI, F. et al. Testicular effects following in utero exposure to the antivirals acyclovir and ganciclovir in rats. **Toxicological Sciences**, v. 139, n. 1, p. 220–233, 2014.

PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of reproduction and fertility**, v. 17, n. c, p. 555–557, 1968.

RANG, H. P. et al. Farmacologia 7ª Edição. **Elsevier: Rio de Janeiro**, v. 77, p. 768, 2011.

SHARPE, R. M. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. v. 20, n. 1, p. 91–110, 2006.

SHERLEY, J. L.; KELLY, T. J. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 17, p. 8350–8, 15 jun. 1988.

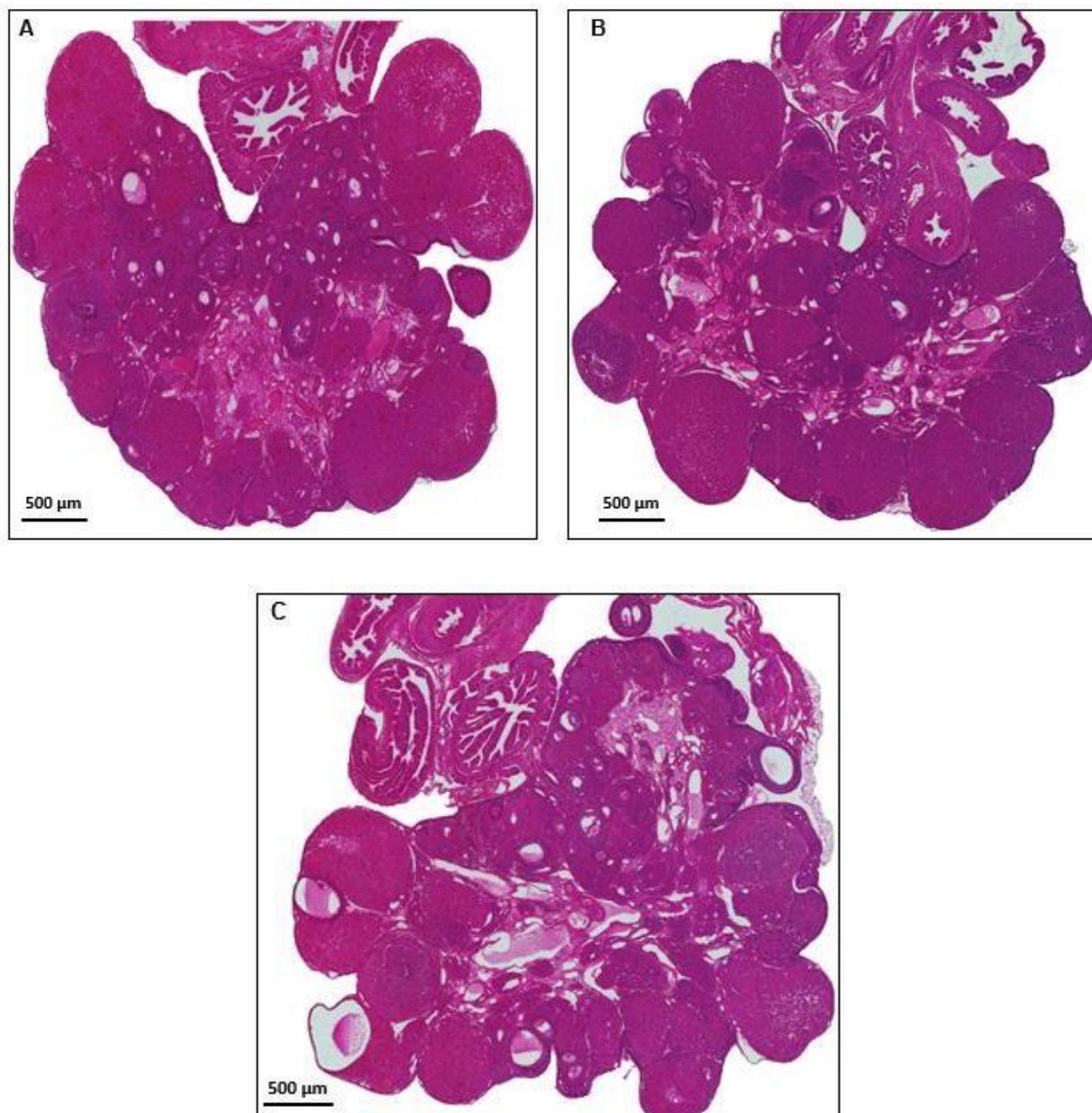
STAHLMANN, R. et al. Prenatal toxicity of Zidovudine in rats. **Teratology**, v. 38, p. 28A, 1988.

TENORIO, B. M. et al. Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field. **Journal of applied toxicology: JAT**, v. 31, n. 3, p. 223–30, 2011.

ZAMA, A. M.; UZUMCU, M. Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: An ovarian perspective. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, n. 4, p. 420–439, 2010.

## APÊNDICE 1 - HISTOLOGIA DOS OVÁRIOS

Aspecto histológico da morfologia ovariana de ratas adultas (90º DPN) em estro expostas *in utero* ao veículo (A) ou ao antiviral ganciclovir no 10º DG (B) ou no 14º DG (C). Não foram observadas alterações com relação ao tamanho e ao peso dos ovários, entretanto houve redução significativa na média do número de folículos dos grupos expostos ao antiviral.





## APÊNDICE 2 – FOLÍCULOS OVARIANOS

As imagens abaixo evidenciam os folículos ovarianos terciário (3º), secundário (2º), primário (1º) e primordial (setas), no aumento de 10x do grupo controle, corados com hematoxilina-eosina.

